Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-Krankenhauses
Berlin-Tempelhof
Chefarzt: Professor Dr. med. W. D. Germer

DER EINFLUSS EINER POCKENVIRUSINFEKTION (EKTROMELIEVIRUS) AUF DIE VERSCHIEDENEN MITOSESTADIEN VON FIBROBLASTEN IN DER GEWEBEKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Han-Kyu Moon
aus Pusan, KOREA

1961

Druck:

Ernst - Reuter - Gesellschaft
der Förderer und Freunde der Freien Universität e.V.

Dissertations - Druckstelle

Berlin-Dahlem, Garystr. 45, Tel.: 76 52 61, App. 668

Aus der Inneren Abteilung des Städtischen Wenckebach-Krankenhauses
Berlin-Tempelhof
Chefarzt: Professor Dr. med. W. D. Germer

DER EINFLUSS EINER POCKENVIRUSINFEKTION (EKTROMELIEVIRUS) AUF DIE VERSCHIEDENEN MITOSESTADIEN VON FIBROBLASTEN IN DER GEWEBEKULTUR

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Han-Kyu Moon
aus Pusan, KOREA

Dekan: Professor Dr. med. Helmut Selbach
Referent: Professor Dr. med. W.D. Germer
Korreferent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 13. AUG. 1961

D I S P O S I T I O N

1) Einleitung und Fragestellung.

2) Methodik.

   a) Gewebekultur.

   b) Zusammensetzung der Medien und Beschreibung der Glaswaren.

   c) Virus-Stamm.

   d) Titerbestimmung des Virus.

   e) Histologische Technik.

   f) Zählung der Mitosen.

3) Ergebnisse.

   a) Ablauf einer Ektromelievirusinfektion in der Gewebekultur.

   b) Einfluss einer Ektromelievirusinfektion auf die Mitose.

   c) Versuch eine Parasynchronisierung der Mitose.

   d) Quantitative Untersuchung zur Arretierung der Prophase.

      α) Vorversuche zur Colchicinwirkung.

      ß) Erfassung der nach Lösung der Prophase-arretierung in die Metaphase übertretenden Mitosen.

      γ) Kontrolle des Infektionsablaufes.

4) Diskussion.

5) Zusammenfassung der Ergebnisse.

6) Literaturübersicht.

1) EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.

Die Virusinfektion von Zellen in der Gewebekultur hat im allgemeinen morphologisch nachweisbare Veränderungen Folge, die zum Absterben der Zellen führen. Das Bild der cytopathischen Veränderungen ist abhängig von der Art des infizierenden Virus (KLÖNE).
Bei der Poliomyelitisvirusinfektion kommt es beispielsweise frühzeitig zu einer Kernpyknose, Abrundung der Zellen und Zerfall derselben. Eine andere Reaktion erzeugen die Viren der Pockengruppe, bei denen sich die Einzelzellen unter Auflösung der Zellgrenzen zu Riesenzellen aneinanderlagern (HERRLICH).
Bei der Infektion von Mäusefibroblasten mit Ektromelievirus (Mäusepocken) in der Gewebekultur ist die Ausbildung dieser Riesenzellen besonders charakteristisch. Hierbei ist die Tatsache von Bedeutung, dass bis zur vollständigen Ausprägung dieses cytopathischen Effektes die Virusreproduktion bereits weitgehend abgeschlossen ist. Auch für die Ektromelievirusinfektion von Mäusefibroblasten konnte dies bestätigt werden (DIEFENTHAL und HABERMEHL).

Unabhängig von diesen gröberen morphologischen Veränderungen war in den frühen Stadien des Infektionsablaufes, die zeitlich der Latenzphase zuzuordnen sind, eine Störung des Mitoseablaufes zu beobachten. Es fand sich eine auffällige Anhäufung von Mitosen im Stadium der Prophase (HABERMEHL und DIEFENTHAL). Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel durchgeführt, durch quantitative Erfassung der einzelnen Mitosestadien eine Klärung der durch die Ektromelievirusinfektion bedingten Änderung des Mitoseablaufes zu erhalten.

2) METHODIK.

a) Gewebekulturen.

Mäusefibroblasten.

Es wurden Kulturen von embryonalen Mäusefibroblasten angelegt. Hochtragende Mäuse eines in Familienzucht gehaltenen Agnes Bluhm Inzuchtstammes wurden durch Dekapitation getötet und die Embryonen unter sterilen Bedingungen entnommen.
Nach Eventerierung der Embryonen erfolgte Zerkleinerung derselben mit der Schere in Stücke von etwa 2-3 mm Kantenlänge. Anschliessendes Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) nach DULBECCO und Überführung der Gewebestücken in eine 0,2 %ige Trypsinlösung in PBS. Der Aufschluss der Gewebestücken wurde sodann in einem 300 ml Erlenmeyer Kolben vorgenommen, in welchem die in der Trypsinlösung befindlichen Gewebestücken durch einen Magnetrührstab bei 37°C in gleichmässiger Bewegung gehalten wurden.
Durch Zugabe von Glasperlen wurde die Ablösung von Einzelzellen aus dem Zellverband unterstützt.
In Abständen von 20-30 Minuten wurde die überstehende Trypsinlösung mit den abgelösten Einzelzellen und Zellverbänden abgesaugt und bei einer Temperatur von 0°C gesammelt.
Das abgesaugte Medium wurde jeweils durch frische, vorgewärmte Trypsinlösung ersetzt.

Nach dieser, von DULBECCO und YOUNGER angegebenen Methode war es möglich, in etwa 4-5 Stunden den grössten Teil der Gewebe aufzuschliessen.
Die gesammelten Überstände wurden anschliessend bei 500 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert, mit Wachstumsmedium resuspendiert und vermittels Zählung in der Fuchs-Rosenthal-Kammer auf einen Zellgehalt von 200,000 Zellen pro ml eingestellt. Hierauf erfolgte eine Filtration durch eine zweifache Mullage zur Entfernung grösserer Zellkomplexe.
Zur Anzüchtung wurden Roux Flaschen mit 80 ml der Zellsuspension beschickt und bei 37°C inkubiert. Nach 2 Tagen hatten sich die Zellen am Boden des Glasgefässes festgesetzt und zeigten deutliches Wachstum.
Nach Wechsel des Wachstumsmediums wurden die Kulturen 2 weitere Tage inkubiert und waren dann zu einer einschichtigen, konfluenten Zellage von Fibroblasten ausgewachsen.

Passagierung der Gewebekulturzellen.

Zur Passagierung der Fibroblasten wurden 4 Tage alte Kulturen nach Absaugen des Nährmediums mit angewärmter 0,25 %iger Trypsinlösung gewaschen und

danach mit frischer Trypsinlösung überschichtet. Nach einer Einwirkungszeit von etwa 6 Minuten löste sich ein Teil der Zellen von der Glaswand ab, der Rest wurde mit einem Gummischaber von der Glaswand abgelöst. Die in der Trypsinlösung suspendierten Zellen wurden bei 0°C gesammelt und mit 500 Upm 5 Minuten lang zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment mit angewärmtem Wachstumsmedium vorsichtig resuspendiert. Hiernach wurde mit Wachstumsmedium eine Zellzahl von 200,000 Zellen pro ml eingestellt und eine Siebung durch eine zweifache Lage Mull vorgenommen. Von dieser Suspension wurden Petrischalen angesetzt, die mit jeweils 5 ml beschickt wurden. Zur Züchtung in Petrischalen war es notwendig, die Schalen in einem Begasungsgefäss zu halten, in welchem eine Luftfeuchtigkeit von 90 % und ein Kohlensäuregehalt von 5 % eingestellt war.
Nach 2 Tagen zeigten die so angesetzten Kulturen ein dichtes und gleichmässiges Wachstum von Fibroblasten. Die in der Primärkultur evtl. noch vorhanden gewesenen grösseren Zellkomplexe und Reste von Zelldetritus waren jetzt vollständig verschwunden. Zur Ausführung zytologischer Untersuchungen wurden in die Petrischalen vor der Beschickung mit der

Zellsuspension Deckgläschen eingelegt.
Im Verlaufe des Wachstums der Gewebekultur wurden diese Deckgläser ebenso überwachsen wie der Boden der Petrischale und konnten zum gewünschten Zeitpunkt entnommen werden. Die ausgewachsenen Zellen hafteten so fest am Deckglas, dass diese mitsamt den Zellen fixiert und ähnlich wie ein Blutausstrich ohne Einbettung und Schneiden mit dem Mikrotom histologisch verarbeitet werden konnten.

HeLa Zellen.

Bei dem HeLa Zellstamm handelt es sich um einen dauerpassagierbaren Stamm, der aus einem menschlichen Cervix Carcinom 1953 angezüchtet wurde und seitdem in der Gewebekultur passagiert wird (SCHERER,SYVERTON und GEY). Der Zellstamm wird in Flaschen direkt auf Glas gezüchtet. Die Passage erfolgt nach Ablösung der Zellen mit 0,2 %iger Trypsinlösung, Zentrifugation 5 Min. bei 500 Upm und Resuspendieren in Wachstumsmedium, wobei die Zellzahl auf 200,000 Zellen pro ml eingestellt wurde. Nach 3 Tagen war der Boden des Kulturgefässe mit einer dichten einschichtigen, epithelialen Zellage bewachsen.

b) Zusammensetzung der Medien und Beschreibung der Glaswaren.

Earle'sche Lösung:

NaCl	6,8 g
KCl	0,4 g
$CaCl_2.6H_2O$	0,2 g
$MgSO_4.7H_2O$	0,2 g
$NaH_2PO_4.2H_2O$	0,14g
$NaHCO_3$	2,2 g
Glucose	1,0 g
Glas destill.Aqua bidest.	1000,0ml
Phenolrot Sol.1%ig(Difco)	0,3ml

Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) nach DULBECCO:

NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$	0,15g
KH_2PO_4	0,2 g
$MgCl_2.6H_2O$	0,1 g
$CaCl_2.6H_2O$	0,1 g
Glas destill.Aqua bidest.	1000,0ml

Nährmedium:

Lactalbuminhydrolysat(NB Co.)	6,0 g
Yeastolate(Difco)	2,4 g
Earle'sche Lösung	1000,0ml
100 γ Streptomycin/ml	
100IE Penicillin/ml	
50E Moronal/ml	

Wachstumsmedium:

Kälberserum (nicht inaktiviert)		20 ml
Nährmedium	ad	100 ml

Erhaltungsmedium:

Pferdeserum (30 Min. bei 56°C inaktiviert)		3,0 ml
Nährmedium	ad	1000,0 ml

Sterilisation der Nährmedien und Seren vermittels Filtration durch Seitz EKS-Filter.

Zusammensetzung der Agarmischung:

24 Teile Difco-Agar purified 2,7 %ig, 12 Teile 6 fach konzentrierte Lactalbuminhydrolysat- und Hefeextraktlösung in Aqua bidest., 16 Teile vierfach konzentrierte Earle'sche Lösung ohne Natr.bicarb., 12 Teile Natr.bicarb.Lösung (0,88g auf 75 ml Aqua bidest.),

36 Teile Nährmedium, 3 Teile Pferdeserum, inaktiviert. Zusatz von Penicillin, Streptomycin und Moronal in Konzentration von 100IE,100γ bzw.50E. Sterilisierung des Agars im Dampftopf, der übrigen Bestandteile vermittels Filtration durch Seitz EKS-Filter. Zusammengiessen der einzelnen Bestandteile und Beschicken der Petrischalen bei 41,3°C.

Glaswaren:

Züchtungsflaschen der Firma Schott & Gen. Mainz aus Geräteglas 20. Petrischalen der Firma Schott und Gen.aus Geräteglas 20, in Formen Mund-geblasen oder Petrischalen Marke Anumbra der Glashütte Wertheim aus Duranglas.

Behandlung der Glaswaren:

Säuerung für 12 Stunden in Schwefel/Salpeter-säuregemisch (5:1), Wässerung für 24 Stunden in fliessendem Leitungswasser, kurze Spülung in 1 % Natr. bicarb.Lösung, Spülung 15 mal unter fliessendem warmen Leitungswasser, 2 malige Spülung in Aqua bidest., Trockung 15 Min. bei 140°C, Sterilisation im Heissluft-schrank während 90 Min. bei 160°C. Reinigung der Glas-waren von Gewebekulturresten mit heisser Pril-Lösung, ansonsten Behandlung wie oben angeführt.

Herkunft der Chemikalien:

Trypsin 1:300 der Firma Nutritional Biochemical Corp., Lactalbuminhydrolysate der Firma Nutritional Biochemical Corp. TC Yeastolate der Firma Difco Labor. Bei den Salzen und Glucose handelt es sich um analysenreine Substanzen der Firma Merck, Darmstadt.

c) Virusstamm:

Verwendet wurde Ektromelievirus (Mäusepocken), welches in der Gewebekultur einen charakteristischen cytopathischen Effekt hervorruft und auf Mäusefibroblasten gezüchtet und titriert werden kann (DIEFENTHAL und HABERMEHL).
Es kamen 2 Stämme zur Anwendung:
Bei dem Stamm Ekt.5/1 vom 10.8.1960 handelt es sich um einen im Verlaufe einer Ektromelie-Endemie in einer Berliner Mäusezucht vom hiesigen Laboratorium isolierten Stamm (GERMER und Mitarbeiter).
Bei den Viruschargen Ekt.3 vom 10.8.1960 und Ekt.6 vom 27.10.1960 handelt es sich um einen Stamm, der nach etwa 60 Eipassagen auf Mäusefibroblasten passagiert wurde.

d) Die Titerbestimmung erfolgt nach der von DULBECCO entwickelten Plaque-Auszählung auf Monolayerkulturen in Petrischalen. Das zu untersuchende Virus wurde in Zehnerpotenzen mit Nährmedium verdünnt.
Je 2 Petrischalen wurden mit 0,3 ml der entsprechenden Virusverdünnung überschichtet und 2 Stunden bei 37°C im Begasungsgefäss inkubiert. Anschliessend wurde das Inokulum abgesaugt und die Zellen der Petrischale mit 3 ml einer Nähragarmischung überschichtet.
6 Tage nach der Inokulation wurden die Schalen mit 1:3000 verdünnter Neutralrotlösung 2 Stunden lang angefärbt und die entstandenen "plaqueförmigen Läsionen" (DIEFENTHAL und HABERMEHL) ausgezählt.

e) Histologische Technik:

Die aus den Petrischalen entnommenen Deckgläser wurden in PBS gespült zur Entfernung von Nährmedium- und Serumresten. Fixierung 15 Min. in einer Mischung von Alkohol abs. und 35 %igem Formalin in Verhältnis 9:1. Die Präparate wurden in üblicher Weise durch die absteigende und aufsteigende Alkoholreihe gebracht und mit Kanadabalsam eingedeckt.

Färbungen:

a) Hämatoxylin-Eosin in üblicher Weise

b) Feulgen Färbung.

Überführen in Aqua bidest., kurze Spülung in kalter 1 n HCl, 10 Min. Hydrolyse in 1 n HCl bei 60°C, sofortige Abkühlung in 1 n kalter HCl, $1^1/2$ Stunden Schiff'sches Reagenz, 3 mal je 5 Min. Spülung in SO_2-Wasser, anschliessend 15 Min. Wässerung in fliessendem Leitungswasser, Überführung in Aqua bidest. und in die aufsteigende Alkoholreihe. Präparation des Schiff'schen Reagenz und SO_2-Wassers nach LILLIE.

f) Zählung der Mitosen:

Bei der Zählung der Mitosen wurde so vorgegangen, dass je Präparat 1000 Zellen ausgezählt und die hierbei gefundenen einzelnen Mitosestadien registriert wurden. Es wurden hierbei jeweils verschiedene Bereiche eines Präparates ausgezählt.

3) E R G E B N I S S E.

a) Ablauf einer Ektromelievirusinfektion in der Gewebekultur.

Wird eine Gewebekultur von Mäusefibroblasten mit Ektromelievirus infiziert, so finden sich vom Zeitpunkt der Infektion an bis etwa zur 12 Stunde p.i. keine morphologisch fassbaren Veränderungen der Zellen. Nach 12 bis 14 Stunden ist ganz vereinzelt eine Aneinanderlagerung und Verschmelzung von Einzelzellen erkennbar, gleichzeitig sind zu diesem Zeitpunkt die ersten intracytoplasmatischen Einschlusskörper zu beobachten. 24 Stunden nach der Inokulation haben sich die meisten Zellen unter Ausbildung von Riesenzellen aneinandergelagert, die reichlich eosinophile Einschlusskörper aufweisen. Nach 48 Stunden sind nur noch Riesenzellen vorhanden, die zum Teil bereits zerfallen. Die vorliegende Arbeit erstreckt sich auf den Zeitabschnitt des Infektionsablaufes, in dem die Zellen noch keinen sichtbaren cytopathischen Effekt aufweisen.

b) Einfluss einer Ektromelievirusinfektion auf die Mitose.

Durchführung des Versuches:

Zwei Tage alte Gewebekulturen der ersten Zellpassage kamen zur Anwendung. Die für den Versuch vorgesehenen Petrischalen wurden nach Absaugen des Wachstumsnährmediums einmal mit je 3 ml Earle'scher Lösung gewaschen und dann mit 1,5 ml Virusinokulum überschichtet. Inokuliert wurde mit der Viruscharge "Ekt.3 vom 10.8.1960" in einer Verdünnung von 10^{-1}; 1 ml der Inokulationsflüssigkeit enthielt $1{,}6.10^5$ plaquebildende Einheiten. Kontrollschalen wurden in gleicherweise gewaschen und erhielten statt des Virusinokulums 1,5 ml serumfreie Nährlösung.
Um Änderungen im Ablauf der Stoffwechselvorgänge zu vermeiden, wurden Waschflüssigkeit und Virusinokulum auf 37°C vorgewärmt und die Manipulationen bei der gleichen Temperatur vorgenommen.
Um zeitliche Differenzen im Ablauf der Infektion auszuschliessen, erfolgte die Behandlung der Versuchs- und Kontrollschalen gleichzeitig innerhalb eines Zeitraumes von insgesamt 10 Minuten. Die Inkubation während der gesamten Versuchsdauer erfolgte im

Begasungsgefäss bei 90 % relativer Feuchtigkeit und 5 % CO_2 in Luft. Zwei Stunden nach erfolgter Inokulation, einem Zeitpunkt, zu dem nachweislich der Adsorptionsvorgang weitgehend abgeschlossen ist, wurde das Virusinokulum abgesaugt und die Kulturen mit 4 ml auf 37°C vorgewärmten Erhaltungsnährmedium überschichtet. Bei den Kontrollkulturen wurden die 1,5 ml Nährlösung ohne Serumzusatz abgesaugt und ebenfalls durch 4 ml Erhaltungsnährmedium ersetzt.

Zu den entsprechenden Untersuchungsterminen wurde jeweils ein Deckglas aus den Petrischalen entnommen und in der oben angeführten Weise histologisch präpariert. Folgende Untersuchungstermine nach der Inokulation wurden gewählt; 30 Min., 1, $1^1/2$, 2, 3, 4, 6, 8, 11, 16, 24 Stunden. Präparate aus nicht infizierten Kontrollschalen wurden nach 30 Minuten, 6 und 24 Stunden untersucht.

Die zahlenmässige Verteilung der einzelnen Mitosestadien ist in der Tabelle 1 und Fig.1 dargestellt.

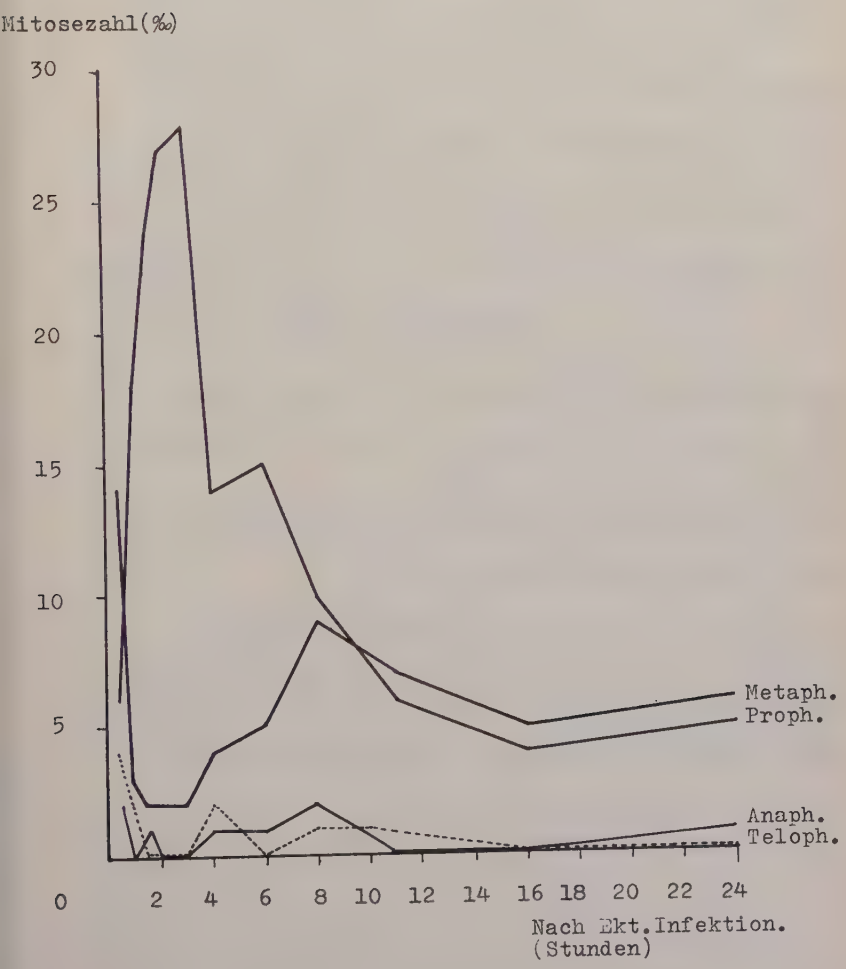
T a b e l l e Nr. 1

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:

Zeitpunkt n.d. Inokulation. (Stunden)	Mitoserate ‰				
	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1/2	6	14	2	4	26
1	18	3	0	2	23
1 1/2	24	2	1	0	27
2	27	2	0	0	29
3	28	2	0	0	30
4	14	4	1	2	21
6	15	5	1	0	21
8	10	9	2	1	22
11	6	7	0	1	14
16	4	5	0	0	9
24	5	6	1	0	12
Kontrolle.					
1/2	4	14	2	5	25
6	6	26	6	8	46
24	3	17	4	4	28

F i g u r Nr. 1

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:



Bereits 1 Stunde nach der Virusinokulation findet sich ein deutlicher Anstieg der Prophaserate, der sein Maximum in der 2.-4. Stunde nach der Inokulation erreicht. Die Zahl der Prophasen beträgt zu diesem Zeitpunkt etwas das 3 fache des Normalwertes.
Während das gleichen Zeitraumes ist ein Abfall der Metaphaserate zu beobachten, der zeitlich dem Anstieg der Prophaserate entspricht. Hieran anschliessend bis zur 8.Stunde nimmt die Prophaserate erheblich ab und dem entsprechend die Zahl der Metaphasen zu.
Die Anaphasen und Telophasen zeigen ein gleichsinniges Verhalten wie die Metaphasen, eine sichere Beurteilung ist jedoch wegen der geringen Zahl dieser Mitosestadien nicht möglich. Im weiteren Verlauf zeigt sich von der 8.-24. Stunde sowohl eine Abnahme der Prophasen als auch der Metaphasen. Zur Sicherung des Befundes wurde der Versuch mit einem anderen Stamm des Ektromelievirus (Ekt.5/1 vom 10.8.1960) wiederholt.
Dieser Versuch wurde zu einem anderen Zeitpunkt mit einem neuen Zellansatz durchgeführt.
Der Versuch erfolgte unter gleichen Bedingungen, lediglich das Virusinokulum wurde zu einem späteren Zeitpunkt (4 Stunden) durch Erhaltungsnährmedium ersetzt, das Virusinokulum enthielt $7{,}4.10^{6}$ Plaque-bildende

Einheiten pro ml und die Beobachtungszeit erstreckte sich über 11 Stunden. Folgende Untersuchungstermine wurden gewählt; 30 Min., 1, $1^1/2$, 2, $2^1/2$, 3,4, 6, und 11 Stunden nach der Inokulation.
Die Untersuchung der Kontrollpräparate erfolgte nach 1, 2, und 4 Stunden. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 2 und Fig.2 dargestellt.
Bei diesem Versuch können im wesentlichen die gleichen Befunde wie im Versuch Nr.1 erhoben werden.
Die Änderungen der Mitosestadien zeigen zeitlich einen gleichen Ablauf, lediglich die Höhe des Prophaseanstiegs und der Abfall der Metaphasen ist nicht so deutlich ausgeprägt.

c) Versuch einer Parasynchronisierung der Mitosen:

Um den Infektionsbeginn zu bestimmten Stadien der Mitose erfolgen zu lassen wurde versucht, sämtliche Mitosen zum gleichen Zeitpunkt ablaufen zu lassen. Nach STOKER und NEWTON (1959) ist die Parasynchronisierung der Zellteilung einer Gewebekultur durch Anwendung eines Kälteschocks möglich. Entsprechend den Angaben dieser Autoren wurden die Gewebekulturen 1 bzw.2 Stunden bei 4°C gehalten und anschliessend wieder bei 37°C inkubiert.
Im einzelnen wurde so verfahren, dass Petrischalen mit gut ausgewachsenen Gewebekulturen von Mäusefibroblasten oder Hela Zellen für den genannten Zeitraum bei 4°C im Kühlschrank aufgewahrt wurden, anschliessende Überführung in den Brutschrank bei 37°C und Entnahme von Deckgläsern nach 3, 16, 18, 20 und 24 Stunden. Registrierung der Mitosestadien (Tab.3) und Festlegung der Mitoserate (Fig.3) zeigen sowohl bei Hela Zellen als auch bei Mäusefibroblasten zwischen der 16. Stunde und 20. Stunde einen deutlichen Anstieg der Mitoserate. In dem Zeitraum zwischen der Abkühlung und der 16. Stunde waren jedoch noch regelmässig eine grössere Anzahl von Mitosen erkennbar, so dass eine komplette synchronisierung nicht erzielt konnte.

Aus diesem Grunde konnte diese Versuchsanordnung für die obige Fragestellung nicht angewendet werden.

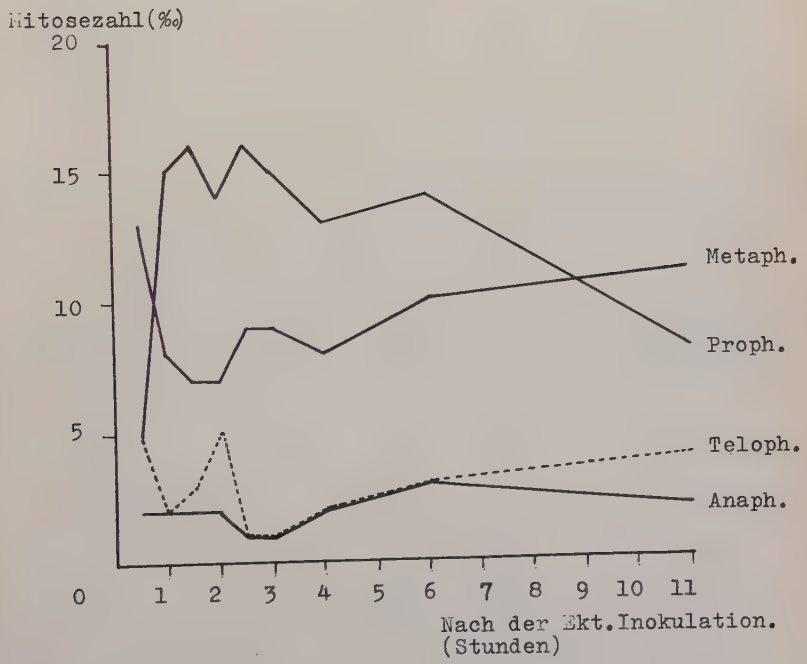
T a b e l l e Nr.2

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:

	Mitoserate ‰				
Zeitpunkt n.d. Inokulation. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1/2	5	13	2	5	25
1	15	8	2	2	27
$1\frac{1}{2}$	16	7	2	3	28
2	14	7	2	5	28
$2\frac{1}{2}$	16	9	1	1	27
3	15	9	1	1	26
4	13	8	2	2	25
6	14	10	3	3	30
11	8	11	2	4	25

F i g u r Nr. 2

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:



T a b e l l e Nr.3 (a)

Versuch einer Parasynchronisierung der Mitosen durch Kälteschock:

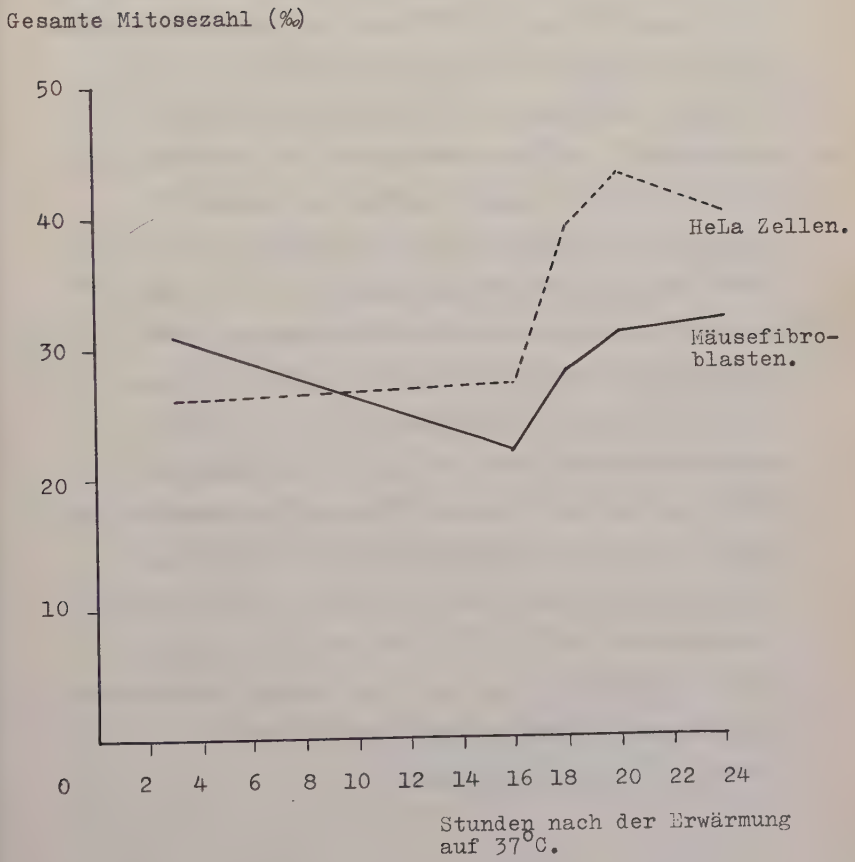
	Mäusefibroblasten				
Zeit n.erwärmung auf 37°C. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
3	2	24	2	3	31
16	3	16	2	1	22
18	2	19	4	3	28
20	1	21	5	4	31
24	0	30	0	2	32

T a b e l l e Nr.3 (b)

	HeLa-Zellen				
Zeit n.erwärmung auf 37°C. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
3	9	10	3	4	26
16	10	8	5	4	27
18	11	17	4	7	39
20	13	16	8	6	43
24	15	17	4	4	40

F i g u r Nr. 3

Versuch der Parasynchronisierung der Mitosen durch Kälteschock:



d) Quantitative Untersuchungen zur Arretierung der Prophase.

α) Vorversuche zur Colchicinwirkung (Reihe 1 der Tab.5).

Bezüglich der Colchicinwirkung wurde entsprechend den Angaben von LETTRE', LEBLOND und DUSTIN vorgegangen. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse lassen erkennen, dass die Reaktionsweise des hier verwendeten Zellsystems mit den in der Literatur gemachten Angaben übereinstimmt. Zur Blockierung der Mitosen in der Metaphase wurde N-Desacetyl-Colchicin (Colcemid,CIBA) angewendet. In Vorversuchen wurde die wirksame Dosis für das hier vorliegende Zellsystem erprobt.
Die Petrischalen mit den Gewebekulturen wurden nach Entfernung des Wachstumsnährmediums mit 4 ml auf 37°C vorgewärmten Erhaltungsnährmedium überschichtet, welchem N-Desacetyl-N-Methyl Colcemid in einer Endkonzentration von 1.10^{-4}mg/ml beigefügt war.
Die Petrischalen wurden in einem Begasungsgefäss bei 37°C inkubiert und 30 Min.,3^{h}, und 6^{h} nach der Colchicin Zugabe wurde jeweils ein Deckglas entnommen und histologisch untersucht.Bei Anwendung einer Colchicin Konzentration von 1.10^{-4} mg/ml Kulturflüssigkeit konnte einerseits eine fast vollständige Blockierung der Mitosen in der Metaphase erzielt werden, andererseits waren die durch

das Colchicin zu beobachtenden Begleiterscheinungen wie Verklumpung der Chromosomen und Schrumpfung der in der Metaphase befindlichen Zellen bei dieser Konzentration noch nicht ausgeprägt. Letzteres wär von besonderer Bedeutung, weil in dem geplanten Versuch während des Ablaufes einer Ektromelievirus-infektion eine Behandlung der Zellen mit Colchicin vorgesehen war. In Figur 4 wird der Colchicin-einfluss auf eine Gewebekultur embryonaler Mäusefibro-blasten dargestellt. Die Zellen der untersuchten Gewebekultur entstammten demselben Kulturansatz, der für den im nächsten Abschnitt geschilderten Versuch zur Anwendung kam. Wie aus der Figur ersichtlich, bleibt die Prophaserate konstant, während die Metaphaserate innerhalb eines Zeitraumes von 6 Stunden einen annähernd linearen Anstieg um das Doppelte des Ausgangswertes aufweist.
Die Telo- und Anaphasen gehen während dieses Zeit-raumes zahlenmässig zurück, verschwinden jedoch ebenfalls nicht vollständig.

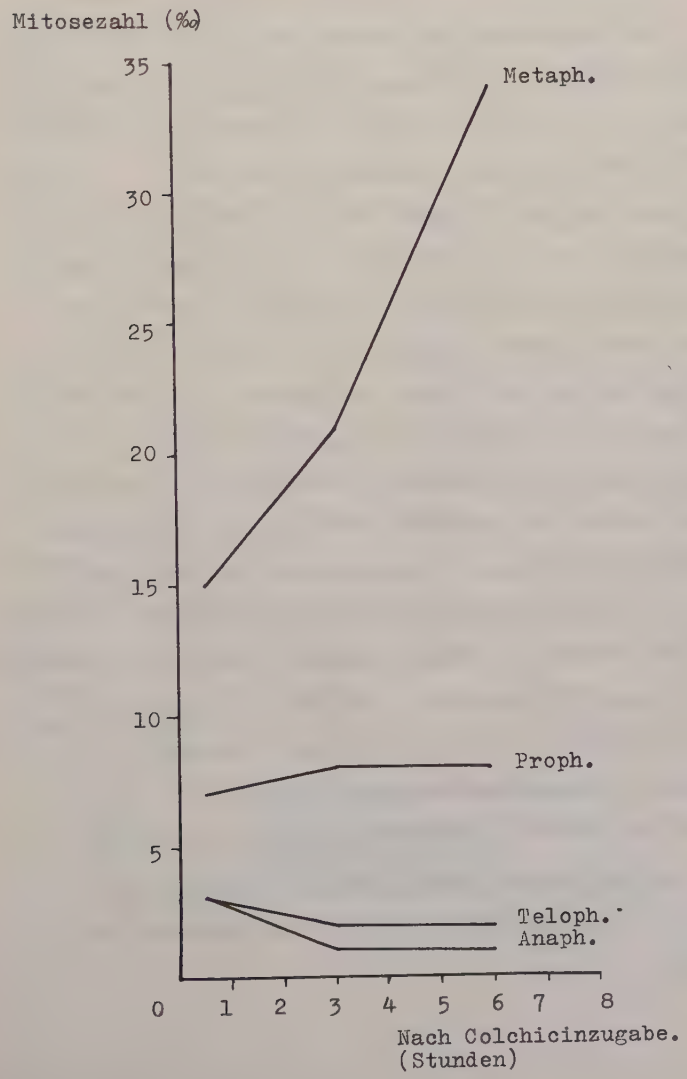
T a b e l l e Nr.4

Colchicin Behandlung embryonaler Mäusefibroblasten in der Gewebekultur:

	Mitoserate %				
Versuchzeitpunkt n.d.Col. Zugabe. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1/2	7	15	3	3	28
3	8	21	1	2	32
6	8	34	1	2	45

F i g u r Nr. 4

Colchicin Behandlung embryonaler Mäusefibroblasten in der Gewebekultur:



ß) Erfassung der nach Lösung der Prophasearretierung in die Metaphase übertretenden Mitosen:

Weiterhin sollte der Nachweis erbracht werden, dass die Zunahme der Prophasestadien auf einer Verlängerung des zeitlichen Ablaufes der Prophase beruht, und dass nach Überwindung dieser Arretierung die Prophasen in die Metaphase übergehen.
Zur quantitativen Erfassung der neu auftretenden Metaphasen war es erforderlich, eine möglichst komplette Blockierung derselben durch Colchicin zu erreichen.
Im dem nachfolgenden Versuch wurde unter gleichen kulturellen und zeitlichen Bedingungen wiederum der Einfluss einer Ektromelievirusinfektion auf die Mitosestadien einer Gewebekultur untersucht und weiterhin in einer parallel angesetzten Untersuchung der gleiche Infektionsablauf unter Colchicineinfluss beobachtet.
Da die Colchicinwirkung nach Ansicht mehrerer Autoren nach 6-8 Stunden nachlässt, wurden 2 weitere Untersuchungen parallel durchgeführt, in denen die späten Zeitabschnitte nach der Ektromelievirusinfektion gesondert erfasst wurden (DUSTIN u.a.).
Um die zeitlichen Zusammenhänge der geschilderten Versuchsanordnungen besser darstellen zu können, wird das nachfolgende Versuchsschema demonstriert (Tab.5).

T a b e l l e Nr.5

Arbeitsplan zur zeitlichen Durchführung für die Erfassung der nach Lösung der Prophase Arretierung in die Metaphase übertretenden Mitosen:

Versuchs-reihe.	1 (Fig.4)	2 (Fig.6)	3 (Fig.7)	4 (Fig.8)	5 (Fig.9)
Versuchs-zeit.					
-30 Min.	-	-	Col.	-	-
0 Min.	Col.	Ekt.	Ekt.	Ekt.	-
30 Min.	Hist.	-	Hist.	-	-
1 St.	-	Hist.	Hist.	-	-
1,5 St.	-	-	Hist.	-	-
2 St.	N.M.	N.M.	N.M. Hist.	N.M.	N.M.
3 St.	Hist.	Hist.	Hist.	-	-
4 St.	-	Hist.	Hist.	-	-
5 St.	-	-	-	Col.	Col.
6 St.	Hist.	Hist.	Hist.	Hist.	Hist.
8 St.	-	Hist.	Hist.	Hist.	Hist.
10 St.	-	Hist.	-	Hist.	Hist.

§ Erklärung:

Hist.....Histologische Untersuchung.
Ekt.....Ektromelievirus Inokulation.
N.M.....Nährmediumwechsel.
Col.....Colchicin Zugabe 1.10^{-4}mg/ml.

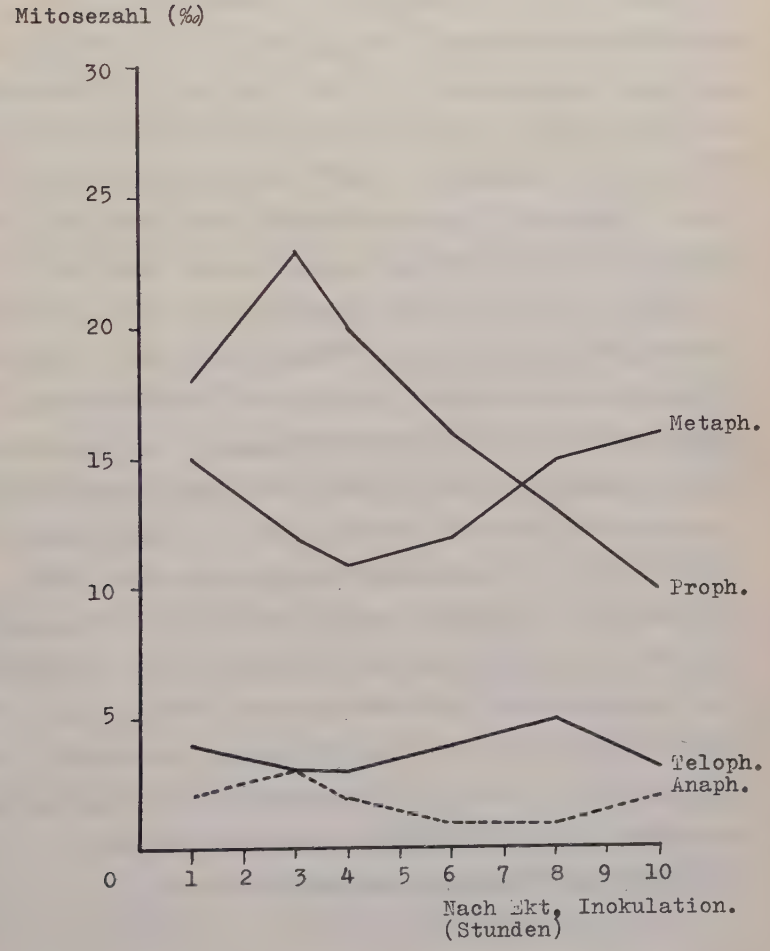
T a b e l l e Nr.6

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:

	Mitoserate ‰				
Zeitpunkt n.d. Inokulation. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1	18	15	2	4	39
3	23	12	3	3	41
4	20	11	2	3	36
6	16	12	1	4	33
8	13	15	1	5	34
10	10	16	2	3	31

F i g u r Nr. 6

Verteilung der Mitosestadien während einer Ektromelie-virusinfektion:



Einfluss der Ektromelievirusinfektion auf die Mitosestadien: (Reihe 2 der Tab.5)

Dieser Versuch diente zur Kontrolle des Colchicinversuches. Die Petrischalen mit Gewebekulturen von Mäusefibroblasten der 1. Passage wurden nach Entfernung des Wachstumsnährmediums 1 x mit 3 ml Nährmedium gewaschen und jeweils mit 1,5 ml Ektromelievirus der Charge Ekt.6 v.27.10.1960 inokuliert. Diese Viruscharge hatte einen Gehalt von $9{,}7.10^6$ Plaque-bildenden Einheiten pro ml. Sämtliche Medien sowie das Inokulationsvirus wurden bei $37^{\circ}C$ im Begasungsgefäss gehalten. 1, 3, 4, 6, 8 und 10 Stunden nach der Inokulation wurde jeweils ein Deckglas entnommen und histologisch untersucht. 2 Stunden nach der Inokulation war in sämtlichen Schalen das Inokulationsvirus abgesaugt und durch 4 ml Erhaltungsnährmedium ersetzt worden. Wie aus Tab.6 und Fig.6 ersichtlich, findet sich wiederum ein Anstieg der Prophaserate mit einem Maximum zur 3. Stunde und einer anschliessenden Abnahme bis zum Ende der Beobachtungszeit auf einen Punkt unterhalb des Ausgangswertes. Die Metaphaserate verhält sich gegensinnig. Es zeigt sich eine Abnahme mit einem Minimum zur 4. Stunde und eine anschliessende Zunahme der Metaphasen bis zur 10.Stunde. Das Verhalten der Anaphasen und Telophasen ist uncharakteristisch.

Einfluss der Ektromelievirusinfektion auf die Mitosestadien und Arreteirung der Metaphasen durch Colchicin: (Reihe 3 der Tab.5)

Die Petrischalen mit Gewebekulturen der gleichen Passage wurden nach Absaugen des Wachstumsnährmediums mit je 1,5 ml Erhaltungsnährmedium und N-Desacetyl-N-Methyl-Colchicin in einer Konzentration von 1.10^{-4}mg/ml überschichtet. Sämtliche Medien waren auf 37°C vorgewärmt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Min. im Begasungsgefäss wurde das colchicinhaltige Erhaltungsnährmedium abgesaugt und jede Schale mit 1,5 ml einer Ektromelievirussuspension der Charge Ekt.6 v. 27.10.1960 überschichtet, die einen Colchicingehalt von 1.10^{-4}mg/ml aufwies, sodass der Colchicingehalt der Kulturflüssigkeit unabhängig vom Inokulationsvorgang konstant blieb. Diese Viruscharge hatte ebenfalls einen Gehalt von $9,7.10^{6}$ Plaque-bildenden Einheiten pro ml. Anschliessend Inkubation im Begasungsgefäss und Absaugen der Inokulationsflüssigkeit nach 2 Stunden. Das Inokulationsmedium wurde durch jeweils 4 ml Erhaltungsnährmedium ersetzt, welches Colchicin in einer Konzentration von 1.10^{-4}mg/ml enthielt. Weitere Inkubation im Begasungsgefäss bei 37°C. Zum Zeitpunkte der Virusinokulation, 30 Minutan nach Colchicinzusatz wurde ein Deckglas zur histologischen

Untersuchung entnommen, weitere Entnahmen erfolgten 30 Min., 1, 1 1/2, 2, 3, 4, 6, und 8 Stunden nach der Virusinokulation. Fig.7 und Tab.7 zeigen erneut den typischen Anstieg der Prophasestadien mit dem Maximum bei 3.Stunde und dem anschliessenden Abfall. Die Metaphaserate bleibt bis zur 4.Stunde konstant, anschliessend erfolgt eine zunächst mässige, später starke Zunahme der Metaphasen, die zahlenmässig der Abnahme der Prophasen entspricht. Die Anaphasen und Telophasen liegen niedrig, weisen jedoch keine charakteristischen Änderungen auf.

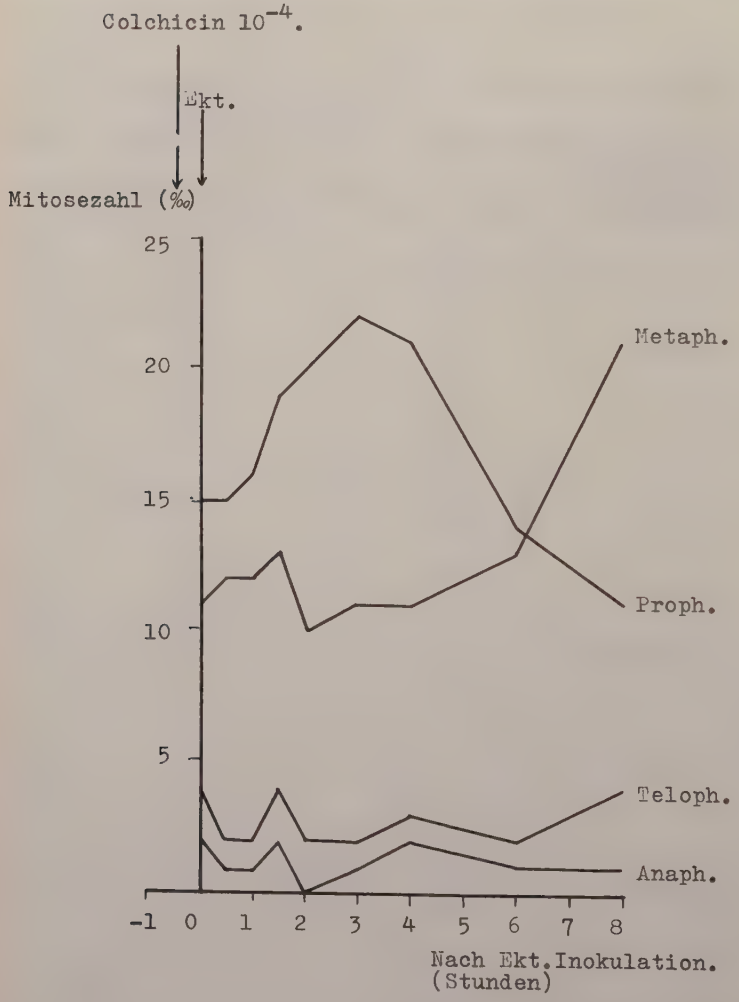
T a b e l l e Nr.7

Einfluss der Ektromelievirusinfektion auf die Mitosestadien und Arretierung der Metaphasen durch Colchicin:

	Mitoserate ‰				
Zeitpunkt n.d. Ekt.Inokulation. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
0	15	11	2	4	32
1/2	15	12	1	2	30
1	16	12	1	2	31
$1\frac{1}{2}$	19	13	2	4	38
2	20	10	0	2	32
3	22	11	1	2	36
4	21	11	2	3	37
6	14	13	1	2	30
8	11	21	1	4	37

F i g u r Nr. 7

Einfluss der Ektromelievirusinfektion auf die Mitose-stadien und Arretierung der Metaphasen durch Colchicin:



Erfassung der späten Stadien des Ektromelievirus-Colchicin Versuchs: (Reihe 4 der Tab.5)

Dieser Versuch wurde, wie oben bereits ausgeführt, vorgenommen, um ein Nachlassen der Colchicinwirkung nach längerer Einwirkungszeit auszuschliessen. Petrischalen mit Gewebekulturen der gleichen Passage wurden nach Absaugen des Wachstumsnährmedium mit 1,5 ml Ektromelievirussuspension der Charge Ekt.6 vom 27. 10.1960 überschichtet und bei 37°C im Begasungsgefäss inkubiert. Nach 2 Stunden wurde das Virusinokulum abgesaugt und durch 4 ml Erhaltungsnährmedium ersetzt. Weitere Inkubation unter obigen Bedingungen.
5 Stunden nach der Virusinokulation wurde das Erhaltungsnährmedium abgesaugt und durch 4 ml Erhaltungsnährmedium mit einem Colchicingehalt von 1.10^{-4}mg/ml ersetzt. Weitere Inkubation und Entnahme von Deckgläsern zur Untersuchung 6, 8 und 10 Stunden nach der Virusinokulation bzw. 1,3 und 5 Stunden nach der Colchicinzugabe.
Aus Tab.8 und Fig.8 geht gute Übereinstimmung mit den entsprechenden Terminen in Fig.7 hervor.
Die Prophaserate nimmt ab, die Metaphaserate zeigt einen steilen Anstieg.

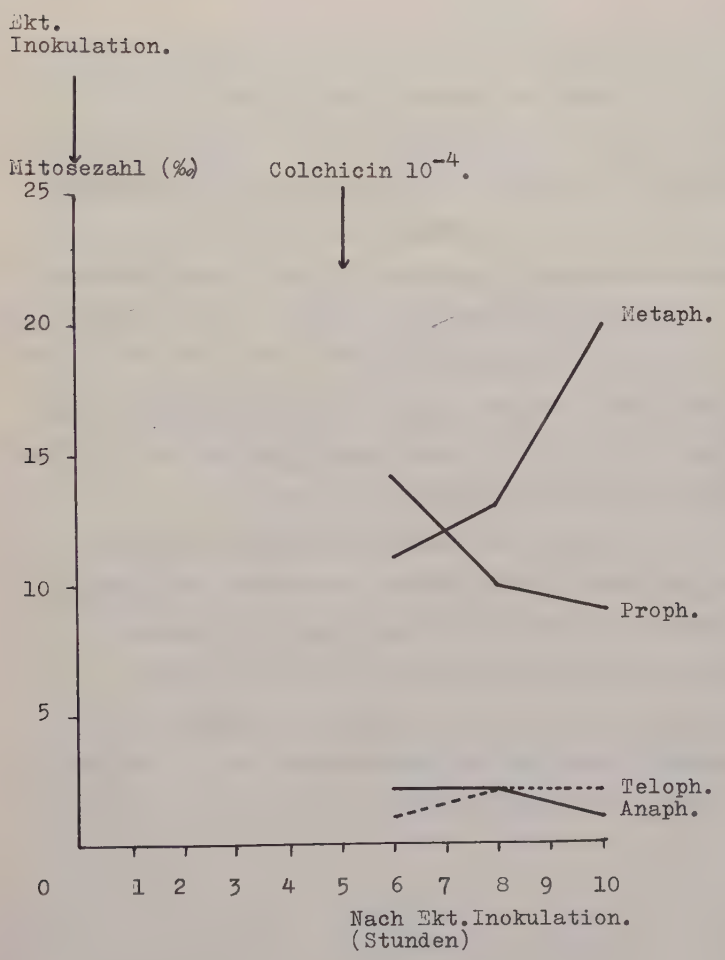
T a b e l l e Nr.8

Erfassung der späteren Stadien des Ektromelievirus-Colchicin Versuchs:

Zeitpunkt nach Colchicinzugabe. (Stunden)	Mitoserate %.				
	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1	14	11	2	1	28
3	10	13	2	2	27
5	9	20	1	2	32

F i g u r Nr. 8

Erfassung der späteren Stadien des Ektromelievirus-Colchicin Versuchs:



Kontrolluntersuchung zur Colchicinwirkung während der späten Versuchsstadien: (Reihe 5 der Tab.5)

Um auszuschliessen, dass die Gewebekulturzellen am Ende des Versuchs ein anderes Reaktionsvermögen gegenüber Colchicin aufweisen als zu Beginn, wurde zum gleichen Zeitpunkt wie beim vorhergehenden Versuch eine Untersuchung vorgenommen. Petrischalen mit Fibroblastenkulturen wurden analog den Versuchskulturen zum 2 Stunden-Termin abgesaugt und mit Erhaltungsnährmedium (4 ml je Schale) aufgefüllt.
Nach weiteren 3 Stunden wurde das Erhaltungsnährmedium entfernt und durch ein Erhaltungsnährmedium mit 1.10^{-4}mg/ml N-Desacetyl-N-Methyl-Colchicin ersetzt.
1, 3 und 5 Stunden nach dem Colchicinzusatz wurden Deckgläser zur histologischen Untersuchung entnommen.
Das Ergebnis ist aus Tab.9 und Fig.9 zu ersehen.
Der Verlauf der Prophaserate und der Anstieg der Metaphaserate, sowie das Verhalten von Anaphasen und Telophasen entspricht den Ergebnissen, die zu Beginn des Versuchs erhalten wurden (Fig.4)

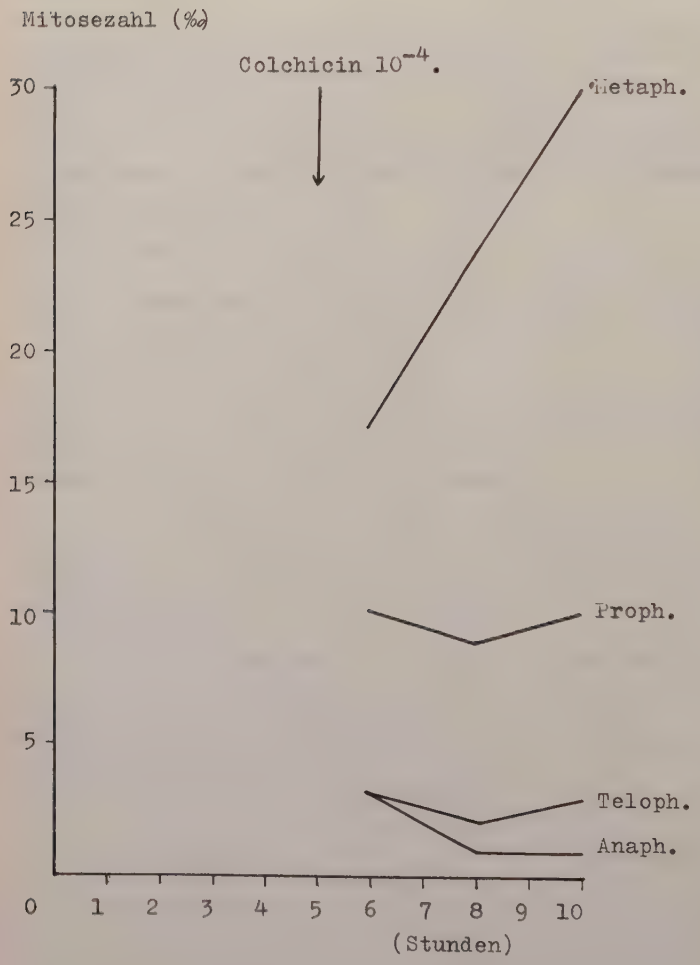
T a b e l l e Nr. 9

Kontroll-Untersuchung zur Colchicinwirkung während der späten Versuchsstadien:

	Mitoserate %				
Zeitpunkt nach d. Colchicinzugabe. (Stunden)	Proph.	Metaph.	Anaph.	Teloph.	Gesamt.
1	10	17	3	3	33
3	9	24	1	2	36
5	10	30	1	3	43

F i g u r Nr. 9

Kontroll Untersuchung zur Colchicinwirkung während der späten Versuchsstadien:



γ) Kontrolle des Infektionsablaufes:

Da der Versuch sich nur auf die ersten Stadien der Virusreproduktion erstreckt, war es notwendig, den Infektionsablauf bis zum Auftreten charakteristischer cytopathischer Veränderungen zu verfolgen.
Hierfür wurde eine Versuchskultur, die mit Ektromelievirus inokuliert war, bis 24 Stunden nach der Inokulation im Begasungsgefäss belassen.
Es zeigten sich nach dieser Zeit in der gesamten Kultur die für eine Ektromelievirusinfektion charakteristischen, vielkernigen Riesenzellen mit eosinophilen, cytoplasmatischen Einschlusskörpern. Sowohl die Zahl als auch das zeitliche Auftreten der Riesenzellen waren typisch für einen regulären Infektionsablauf.

4) D I S K U S S I O N.

Die morphologischen Veränderungen einer Zelle während des Ablaufes einer Virusreproduktion sind unter den verschiedensten Gesichtpunkten untersucht worden. Über den Einfluss einer Virusinfektion auf die Mitose liegen jedoch nur wenige Angaben vor.

Nach einer Infektion von HeLa Zellen mit Herpes simplex-Virus konnten STOKER und NEWTON eine deutliche Hemmung der Zellvermehrung beobachten.
Durch einen Kälteschock gelang es, eine Parasynchronisierung des Zellwachstums zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erzielen und somit beliebige Zeit vor der zu erwartenden Zellteilung die Infektion mit Herpes simplex-Virus einzuleiten.
Hierbei ergab sich, dass eine Hemmung der Zellvermehrung eintrat, wenn die Infektion mindestens $1^1/2$ Stunden vor dem zu erwartenden Zellteilungstermin erfolgte. Die Latenz zwischen der Virusinokulation und der zu beobachtenden Hemmung der Zellvermehrung betrug weniger als eine Stunde. Eine Einschränkung erfahren diese Befunde dadurch, dass diese Autoren lediglich die Zunahme der Gesamtzellzahl registriert, jedoch keinerlei Aussagen über die Mitosen gemacht haben.

Nach einer Infektion von HeLa Zellen mit Newcastle disease-Virus konnten MARCUS und PUCK bei Klonisierungsversuchen nachweisen, dass die Zellteilung fast vollständig unterbunden wurde. Bei Zellen, die sich zum Zeitpunkte der Inokulation in der Mitose befanden, lief der Mitosevorgang noch ab, bevor die Zelle durch die Virusinfektion zerstört wurde.
Auch bei dieser Untersuchung wurde lediglich eine Bestimmung der Zellzahl durchgeführt und keine Untersuchung bzw. Auswertung der Mitosen vorgenommen.

FASTER infizierte Nierenepithelien mit Hundehepatitis Virus und zeigte, dass in beschränktem Umfange Mitosen in infizierten Zellen ablaufen können.
Dieses wurde belegt durch Abbildungen, in denen die für die Infektion charakteristischen Einschlusskörper im Zusammenhang mit Mitosen sichtbar waren.
Weiterhin konnte mit Hilfe fluoreszierender Antikörper nachgewiesen werden, dass während der Mitose Virusantigen vorhanden ist. Die beobachteten Mitosen verliefen regelmässig atypisch.

Der Nachweis, dass in einer infizierten Zelle ein Mitoseablauf möglich ist, wurde weiterhin von WHEELOCK und TAMM erbracht.
Bei HeLa Zellen, die mit Influenza Virus und Newcastle disease-Virus infiziert waren, konnte mit Hilfe

fluoreszierender Antikörper ein kompletter Mitosezyklus in Anwesenheit von Virus beobachtet werden. Das während der Mitose vorhandene Virusantigen war nach Beendigung der Teilung in den Tochterzellen nachweisbar. Aus der Menge des in den Tochterzellen befindlichen Antigens schliessen die Autoren, dass die Infektion der Mutterzelle mindestens 4 Stunden vor Beginn der Zellteilung stattgefunden haben müsse. Es wurde gefolgert, dass die Infektion nicht zu einer Arretierung der Mitose führte.

Ähnliche Ergebnisse erhielt LÖFFLER bei Untersuchungen mit Poliomyelitisviren. Es konnte gezeigt werden, dass infizierte Zellen eine Mitose durchlaufen mit nachfolgendem Absterben der Tochterzellen.

Im Verlaufe einer Pseudorabies-Infektion fanden REISSIG und KAPLAN eine Abnahme der Mitosehäufigkeit. Darüber hinaus wird eine Induktion amitotischer Kernteilungen beschrieben, die nicht von einer Zellteilung gefolgt werden. 10 Stunden nach erfolgter Infektion sollen 40 % der Zellkerne eine amitotische Teilung durchgemacht haben.

Den in den vorhergehenden Beispielen angeführten Infektionen, die in kurzer Zeit zum Absterben der Zelle führen, sind diejenigen Infektionen gegenüber zu stellen,

die nicht oder erst zu einem späten Zeitpunkt einen cytopathischen Effekt bedingen.

Hierzu gehören einerseits die Tumorviren, andererseits die latent verlaufenden Virusinfektionen.
Eine Steigerung der Mitose nach Infektion mit einem Tumorvirus, dem Rous Sarkom-Virus beschrieb PRINCE.
23 Stunde nach der Inokulation der Chorioallantoismembran kam es infolge einer Proliferation zu einer Hyperplasie des Ektoderms,später des Mesoderms.
Den Proliferationsvorgängen bei den Virustumoren und bei latent verlaufenden Virusinfektionen liegen besonders Verhältnisse zu Grunde, die in keinem direkten Zusammenhang mit den in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen stehen und deshalb nicht erörtert werden sollen.
Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde der Einfluss einer Ektromelievirusinfektion auf die einzelnen Mitosestadien untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich der erste Zeitraum des Infektionsablaufes bis zur Ausbildung von Riesenzellen berücksichtigt. Dies entspricht einer Zeitspanne bis zur 10.Stunde nach der Infektion.
Wie gezeigt werden konnte, findet sich ein signifikanter Anstieg der Prophaserate, der bis zur 4.Stunde ansteigt

und dann schnell abfällt.
Dem Anstieg der Prophaserate entspricht eine Abnahme der Metaphaserate mit einem Minimum zur 3.-4. Stunde gefolgt von einem Anstieg.
Aus den obigen Befunden ergab sich die Frage, ob eine Arretierung der Prophasen angenommen werden kann. Es war zu klären, ob die zwischen der 4. und 6. Stunde zu beobachtende Abnahme der Prophasen darauf zurückzuführen ist, dass diese in die Metaphase übertreten. Darüber hinaus bestand auch die Möglichkeit, dass die im Prophasestadium befindlichen Zellen auf Grund der Virusinfektion absterben und sich somit dem Nachweis entziehen. Um die Zahl der in die Metaphase übertretenden Mitosen erfassen zu können, wurden die Metaphasen durch Colchicin blockiert.
Hierbei zeigte es sich, dass bis zur 3. Stunde nach der Infektion die Anzahl der zu registrierenden Metaphasen gleich blieb.
Es waren somit während dieser Zeitspanne sämtliche Mitosen im Stadium der Prophase verblieben und nicht neu in das Stadium der Metaphase übergetreten.
Die anschliessende Zunahme der durch Colchicin blockierten Metaphasen entspricht sowohl in ihrem Ausmass als auch im zeitlichen Ablauf der Abnahme der Prophasen. Hieraus geht hervor, dass die Mitosen bis zum Stadium der späten Prophase ungehindert ablaufen,

dann jedoch vollständig arretiert werden und während der ersten 4 Stunden der Virusinfektion nicht in die Metaphase Übertreten können. (Fig.7)
Zur weiteren Prüfung dieses Phänomens in einem späteren Abschnitt der Virusreproduktion erfolgte die Zugabe des Colchicin erst 5 Stunden nach der Infektion.
Der Anstieg der blockierten Metaphasen gab einen Hinweis darauf, dass zu diesem Zeitpunkt der Infektion ein normaler Übertritt der Prophasen in das Metaphasestadium stattfindet. (Fig.8)
Zeitlich fällt das Phänomen der temporären Prophasearretierung in das Latenzstadium der Virusreproduktion. Welche Vorgänge im Zusammenhang mit der Virusneubildung hierfür bestimmend sind, kann auf Grund der durchgeführten Versuche nicht diskutiert werden.

5) ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.

1) Es wurde eine quantitative Untersuchung der einzelnen Mitosestadien von Mäusefibroblasten in der Gewebekultur nach Infektion mit Ektromelievirus(Mäusepocken) durchgeführt.

2) Während der ersten 4 Stunden nach der Inokulation zeigte sich eine temporäre Arretierung der Mitosen im Stadium der Prophase.

3) Nach der 4. Stunde löste sich diese Arretierung und der Mitosezyklus lief bis zu Ende ab.

4) Durch Blockierung der Metaphasestadien mittels Colchicin konnte nachgewiesen werden, dass die temporär arretierten Prophasen anschliessend in das Stadium der Metaphase übertreten.

LITERATURÜBERSICHT

1. Diefenthal,W. und Habermehl,K.O. :
   Ztbl.Bakt.Orig.1, 175, 67-80, (1959)
2. Dulbecco,R. und Vogt,M. :
   J.Exp.Med. 99, S.167, (1954)
3. Dustin,A.P. :
   Kinetics of cellular proliferation.
   Grune and Stratten-Verlag, New York,
   (1959)
4. Faster,L.B. :
   Virology 10, 542-545, (1960)
5. Germer,W.D., Diefenthal,W. und Habermehl,K.O. :
   Zeitschrift für Hygiene und Infektions-
   krankheiten im Druck.
6. Habermehl,K.O. und Diefenthal,W. :
   Persönliche Mitteilung.
7. Herrlich,A. :
   Die Pocken. Georg Thieme-Verlag,
   Stuttgart, (1960)
8. Klöne,W. :
   Handbuch der Virusforschung. 4,
   203-281, Springer-Verlag, Wien ,
   (1958)
9. Leblond,C.P. :
   Kinetics of the cellular proliferation.
   S.31, Grune and Stratten-Verlag, New York,
   (1959)
10. Lettré,H. :
    Ann.of N.Y. Acad.of Sci. 58, S.1264,
    (1954)

11. Lettré,R. :
Ann.of N.Y. Acad.of Sci. 58, S.1085, (1954)

12. Lillie,R.D. :
Histopathologic technic and practical histochemistry. S.232, Blakiston-Co. New York, (1954)

13. Marcus,P.I. und Puck,T.T. :
Virology 6, 405-423, (1958)

14. Newton,A. und Wildy,P. :
Exp.cell Res. 16, (1959)

15. Prince,A.M. :
Virology 5, 435-457, (1958)

16. Reissig,M. und Kaplan,A.S. :
Virology 11, 1-11, (1960).

17. Scherer,W.F., Syverton,J.T. und Gey,G.O. :
J.Exp.Med. 97, S.695, (1956)

18. Stocker,M.G.P. und Newton,A. :
Virology 7, 438-448, (1959)

19. Wheelock,E.F. und Tamm,I. :
Virology 8, 532-536, (1959)

20. Wildy,P. und Newton,A. :
Biochem.J. 68, S.14, (1958)

21. Younger,J.S. :
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 85, S.202, (1954)

22. Younger,J.S. :
J.Immunol. 76, S.228, (1956)

LEBENSLAUF

Am 3,Okt.1932 wurde ich als Sohn des Regierungsbeamten Sang-Whan Moon und seiner Ehefrau Ki-Yon Chun in Bockchun-Dong, Dongnae-Ku, Pusan geboren.

Vom April 1939 bis März 1945 besuchte ich die Pusanchin Volksschule in Pusan und vom April 1945 bis März 1951 die Kyongnam Oberschule in Pusan.

Vom April 1951 bis März 1953 studierte ich an der Premedical School der Seoul National Universität. Am 20,März 1953 bestand ich das Physikum mit der Note "gut".

Vom April 1953 bis März 1957 studierte ich an der medizinischen Fakultät der Seoul National Universität und legte am 4,April 1957 mein Staatsexamen dem Prädikat "gut" ab.

Vom 20, April 1957 bis 20,April 1958 arbeitete ich als Pflichtsassistent und vom 20,April 1958 bis 20, April 1959 als Assistentarzt unter der Leitung von Herrn Dr.A.Buck im Deutschen Roten Kreuz Hospital in Pusan.

Vom 20,April 1959 bis 20,Feb.1960 war ich als Assistenzarzt in Innere Abteilung der Universitätsklinik Pusan unter der Leitung von Herrn Professor Dr.C.S.Lee .

Seitdem 1,März 1960 arbeite ich als Gastarzt auf der Innere Abteilung des Städtische Wenckebach-Krankenhauses, Berlin-Tempelhof unter der Leitung von Herrn Professor Dr.W.D.Germer.

Gleichzeitig habe ich hier die Durchführung meiner Doktorarbeit begonnen.

Im Anschluss an meine hiesige Tätigkeit beabsichtige ich meine Fachausbildung in den Vereinigten Staaten von Amerika fortzusetzen und dann wieder nach Korea zurückzukehren.